

PCTORGANISATION MONDIALE DE LA PROPRIÉTÉ INTELLECTUELLE
Bureau international

DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITE DE COOPERATION EN MATIÈRE DE BREVETS (PCT)

(51) Classification internationale des brevets ⁶ : G01N 33/533, 33/542, 33/58, C07K 19/00, 14/195	A1	(11) Numéro de publication internationale: WO 96/42016 (43) Date de publication internationale: 27 décembre 1996 (27.12.96)
(21) Numéro de la demande internationale: PCT/FR96/00865 (22) Date de dépôt international: 7 juin 1996 (07.06.96) (30) Données relatives à la priorité: 95/06821 9 juin 1995 (09.06.95) FR (71) Déposant (pour tous les Etats désignés sauf US): CIS BIO INTERNATIONAL (FR/FR); RN 306, F-91400 Saclay (FR). (72) Inventeur, et (75) Inventeur/Déposant (US seulement): MATHIS, Gérard (FR/FR); 17, impasse de la Capelle-des-Ladres, F-30200 Bagnols-sur-Cèze (FR). (74) Mandataires: GILLARD, Marie-Louise etc.; Cabinet Beau de Loménie, 158, rue de l'Université, F-75007 Paris (FR).	(81) Etats désignés: JP, US, brevet européen (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE). Publiée <i>Avec rapport de recherche internationale.</i>	
(54) Title: USE OF A PHYCOBILIPROTEIN-BINDING PEPTIDE COMPLEX AS A FLUORESCENT TRACER (54) Titre: UTILISATION D'UN COMPLEXE PHYCOBILIPROTEINE-PEPTIDE DE LIAISON EN TANT QUE TRACEUR FLUO- RESCENT (57) Abstract <p>The use of a phycobiliprotein-binding peptide complex as a fluorescent tracer in a method using fluorescence to sense and/or determine an analyte in a medium thought to contain said analyte, is disclosed. Fluorescent conjugates consisting of said complex covalently bonded to one of the elements in a ligand/receptor specific binding pair, are also disclosed.</p> (57) Abrégé <p>L'invention concerne l'utilisation d'un complexe phycobiliprotéine-peptide de liaison en tant que traceur fluorescent dans un procédé de détection et/ou de détermination par fluorescence d'un analyte dans un milieu susceptible de le contenir, ainsi que les conjugués fluorescents constitués dudit complexe lié de manière covalente à l'un des éléments d'un couple de liaison spécifique ligand/récepteur.</p>		

Utilisation d'un complexe phycobiliprotéine-peptide de liaison en tant que traceur fluorescent.

L'invention concerne l'utilisation d'un complexe phycobiliprotéine-peptide de liaison en tant que traceur fluorescent, notamment dans un procédé de détection et/ou de détermination par fluorescence d'un analyte dans un milieu susceptible de le contenir, ainsi que les conjugués fluorescents constitués dudit
5 complexe lié de manière covalente à l'un des éléments d'un couple de liaison spécifique ligand/récepteur.

L'utilisation de dosages immunologiques pour l'analyse qualitative et quantitative de composés dans des fluides biologiques est à l'heure actuelle largement répandue.

10 Parmi les techniques existantes, les dosages par fluorimétrie ont pris une importance croissante.

En effet, ils présentent un certain nombre d'avantages parmi lesquels la sensibilité, la rapidité de la mesure, la stabilité et l'inocuité des réactifs marqués par des composés fluorescents et le coût relativement réduit.

15 Les phycobiliprotéines sont des constituants du phycobilisome de différentes bactéries, algues ou cryptomonades et sont en général de quatre types : les phycocyanines, les phycoerythrine, les phycoerythrocyanines et les allophycocyanines.

Elles sont formées de sous-unités α et β , et parfois γ portant chacune un
20 ou plusieurs fluorophores, et sont isolées principalement sous forme de trimères ou d'hexamères.

Certaines d'entre elles sont utilisées comme marqueurs fluorescents en raison de nombreux avantages qu'elles présentent en terme de rendement quantique, bandes d'absorption, stabilité et solubilité (V.Ol et al, J. Cell Biology
25 1982-93 - 981).

Schématiquement, les phycobilisomes sont formés de deux parties :

- le coeur formé d'éléments cylindriques constitués par des allophycocyanines ;
- des bâtonnets, formés d'éléments cylindriques, fixés au coeur, lesdits éléments étant constitués par des phycoerythrine et des phycocyanines.

30 Les bâtonnets et les cylindres sont formés par un assemblage de disques de phycobiliprotéines. Ces disques sont assemblés entre eux ainsi que les bâtonnets au coeur et le coeur à la membrane thylakoïde par des peptides de liaison.

Ces peptides sont nommés en fonction de leur localisation selon la publication A. Glazer, J. Biol. Chem., 1989, 264, 1-4 :

L_R pour peptide de liaison dans le bâtonnet

L_C pour peptide de liaison dans le coeur

L_{RC} pour peptide de liaison dans le bâtonnet-coeur

L_{CM} pour peptide de liaison dans le coeur-membrane.

- 5 La purification des phycobiliprotéines par des méthodes conventionnelles permet l'obtention de complexes trimériques ou hexamériques ($\alpha\beta$)₃ ou ($\alpha\beta$)₆ dépourvus de peptides de liaison. Les trimères ont une forme discoïdale de ~ 30 Å d'épaisseur et de ~ 120 Å de diamètre.

- 10 L'utilisation de phycobiliprotéines, notamment l'allophycocyanine et la phycoerythrine, dans des dosages immunologiques par fluorimétrie est décrite notamment dans EP 0 174 744 et 0 076 695 ainsi que dans les brevets US 4 520 110 et 4 542 104.

- 15 Il a été trouvé que dans certaines conditions de purification des phycobilisomes, il était possible d'obtenir des complexes phycobiliprotéine-peptide de liaison (P. Fuglistaller et al., Biol. Chem. Hoppe-Seyler, 1987, 368, 353-367). Néanmoins, ces complexes étaient jusqu'à maintenant décrits dans la littérature comme étant relativement peu stables et sensibles aux protéases (W. Reuter et C. Nickel-Reuter, J. Photochem. Photobiol., B : Biol., 1993, 18, 51-66).

- 20 De manière avantageuse, on a maintenant trouvé que ces complexes présentaient des particularités spectroscopiques intéressantes par rapport aux phycobiliprotéines pour une utilisation en tant que traceur fluorescent.

- 25 En effet, un tel complexe phycobiliprotéine-peptide de liaison possède toujours des propriétés spectroscopiques différentes de celles de la phycobiliprotéine seule, avec en général :

- augmentation du rendement quantique
 - et/ou - déplacement de la longueur d'onde d'émission
 - et/ou - modification de la longueur d'onde d'absorption
 - et/ou - modification du coefficient d'absorption molaire
- 30 par rapport à la phycobiliprotéine seule.

Ces propriétés peuvent se révéler particulièrement intéressantes lors de la mise en oeuvre d'un système de détection utilisant un ou plusieurs traceurs fluorescents, dans lequel, outre la stabilité des traceurs dans le milieu, deux paramètres sont d'importance capitale :

- le rendement quantique qui influe directement sur la limite de détection du système,
- la longueur d'onde d'émission qui lors de l'utilisation de plusieurs traceurs est un élément déterminant de leur choix.

5 De façon inattendue, on a maintenant trouvé que :

- ces complexes phycobiliprotéine-peptide de liaison étaient stables en solution et en présence de sérums de différentes origines contenant naturellement différentes protéases,
 - il était possible de fixer de manière covalente ces complexes sur différentes
- 10 protéines et anticorps tout en conservant les propriétés de fluorescence des complexes.

Dans un aspect avantageux, la phycobiliprotéine utilisée selon l'invention est choisie parmi la phycoerythrine, la phycoerythrocyanine, la phycocyanine, l'allophycocyanine et l'allophycocyanine B.

15 Dans la suite de la description, on utilisera les abréviations suivantes pour désigner les phycobiliprotéines préférées : allophycocyanine = AP, phycoerythrine = PE, phycoerythrocyanine = PEC, phycocyanine = PC, allophycocyanine B = APB

20 De préférence, le complexe phycobiliprotéine-peptide de liaison est extrait d'une cyanobactérie choisie parmi *Mastigocladus Laminosus*, *Synechocystis* 6701, *Synechococcus* 6301, *Anabaena variabilis* et *Nostoc spec.*

Le peptide de liaison du complexe utilisé aux fins de l'invention est de préférence choisi parmi les peptides L_R , L_C , L_{RC} et L_{CM} , tels que définis plus haut.

25 De manière avantageuse, les complexes utilisables selon l'invention sont définis de la manière suivante, à partir des phycobiliprotéines telles que désignées par les abréviations mentionnées ci-dessus, des sous-unités α et β et des peptides de liaison mentionnés plus haut :

$(\alpha^{PEC}, \beta^{PEC})_6 L_R$, $(\alpha^{PEC}, \beta^{PEC})_3 L_R$,

30

$(\alpha^{PC}, \beta^{PC})_6 L_R$, $(\alpha^{PC}, \beta^{PC})_6 L_{RC}$, $(\alpha^{PC}, \beta^{PC})_3 L_R$,

$(\alpha^{AP}, \beta^{AP})_3 L_C$, $(\alpha^{APB}, \alpha_2^{AP}, \beta_3^{AP}) L_C$ et $(\alpha^{AP}, \beta^{AP})_2 L_{CM}$.

Avantageusement, on utilisera selon l'invention les complexes phycobilliprotéine-peptides de liaison en combinaison avec un ou plusieurs autres traceurs fluorescents.

Le complexe préféré aux fins de l'invention est le complexe
5 $(\alpha\text{AP}, \beta\text{AP})_3 \text{LC}$, c'est-à-dire un complexe phycobilliprotéine-peptide de liaison constitué d'un trimère de sous-unités α et β d'allophycocyanine et du peptide de liaison dans le coeur.

La longueur des peptides varie suivant l'espèce et les processus de dégradation durant la purification. Elle est de préférence comprise entre 5000 et
10 30000.

Selon un aspect ultérieur, l'invention concerne également un procédé homogène de détection et/ou de détermination par fluorescence d'un analyte dans un milieu susceptible de le contenir, par mise en évidence du produit de la réaction entre l'analyte et au moins un récepteur correspondant, consistant :

- 15 1) à ajouter audit milieu un premier réactif constitué d'au moins un récepteur dudit analyte,
- 2) à ajouter un second réactif choisi parmi l'analyte ou au moins l'un de ses récepteurs, l'un des deux réactifs étant couplé avec un composé fluorescent donneur constitué par un cryptate, un chelate ou un complexe macrocyclique de
20 terre rare et l'autre réactif étant couplé avec un composé fluorescent accepteur, l'ordre d'ajout des réactifs pouvant être inversé et, après excitation du mélange par une source de lumière à la longueur d'onde d'excitation du composé fluorescent donneur,
- 3) à mesurer le signal d'émission du composé fluorescent accepteur,
- 25 caractérisé en ce qu'on utilise comme composé fluorescent accepteur un complexe phycobilliprotéine-peptide de liaison tel que défini ci-dessus.

Dans la présente description, on définit par :

- "analyte" : toute substance ou groupe de substances, ainsi que ses ou leurs analogues, que l'on souhaite détecter et/ou déterminer;
- 30 - "récepteur" : toute substance capable de se fixer spécifiquement à un site dudit analyte;
- "ligand" : toute substance capable de se lier spécifiquement à un récepteur.

Des cryptates de terre rare utilisables dans un tel procédé de dosage ainsi que dans les méthodes par excès ou par compétition décrites ci-après sont notamment décrits dans les demandes EP 0 180 492, EP 0 232 348, EP 0 321 353 ou WO90/04791.

- 5 Des complexes macrocycliques de terre rare portant des groupes N-oxy sont également décrits dans la demande WO93/05049.

Ces cryptates et complexes macrocycliques de terre rare présentent l'avantage d'être très stables en milieu protéique et salin, cette propriété étant particulièrement importante dans le cas des immunoessais homogènes.

- 10 On utilisera de préférence en tant que composé fluorescent donneur dans les procédés et méthodes mentionnées dans la présente description un chélate, un cryptate ou un complexe macrocyclique portant des groupes N-oxy de terbium ou d'euporium.

- 15 Selon un aspect avantageux, ledit procédé est une méthode par excès consistant :

- 1) à ajouter, audit milieu contenant l'analyte recherché, un premier réactif constitué par au moins un récepteur dudit analyte, couplé avec un composé fluorescent donneur constitué par un cryptate, un chélate ou un complexe macrocyclique de terre rare,
- 20 2) à ajouter un second réactif constitué par un ou plusieurs autres récepteurs dudit analyte, ledit second réactif étant couplé avec un composé fluorescent accepteur constitué par un complexe phycobiliprotéine-peptide de liaison,
- 3) à faire incuber ledit milieu après chaque addition de réactifs ou après l'addition des deux réactifs,
- 25 4) à exciter le milieu résultant à la longueur d'onde d'excitation du composé fluorescent donneur,
- 5) à mesurer le signal émis par le composé fluorescent accepteur.

- On pourra notamment utiliser dans lesdits procédés un seul récepteur de l'analyte, qui est couplé soit avec le composé fluorescent donneur, soit avec le composé fluorescent accepteur.
- 30

Dans un autre aspect de l'invention, ledit procédé est une méthode par compétition consistant :

- 1) à ajouter, audit milieu contenant l'analyte recherché, un premier réactif constitué par un récepteur dudit analyte, couplé avec un composé fluorescent donneur

constitué par un cryptate, un chelate ou un complexe macrocyclique de terre rare,

- 2) à ajouter un second réactif constitué de l'analyte couplé avec un composé fluorescent accepteur constitué par un complexe phycobilliprotéine-peptide de liaison,
- 3) à faire incuber ledit milieu après chaque addition de réactifs ou après l'addition des deux réactifs,
- 4) à exciter le milieu résultant à la longueur d'onde d'excitation du composé fluorescent donneur,
- 5) à mesurer le signal émis par le composé fluorescent accepteur.

Avantageusement, ledit procédé homogène de détection et/ou de détermination par fluorescence d'un analyte dans un milieu susceptible de le contenir, par mise en évidence du produit de la réaction entre l'analyte et au moins un récepteur correspondant, est une méthode par compétition consistant :

- 1) à ajouter, audit milieu contenant l'analyte recherché, un premier réactif constitué par un récepteur dudit analyte, ledit récepteur étant couplé avec un composé fluorescent accepteur constitué par un complexe phycobilliprotéine-peptide de liaison,
- 2) à ajouter un second réactif constitué de l'analyte couplé avec un composé fluorescent donneur constitué par un cryptate ou un chelate de terre rare,
- 3) à faire incuber ledit milieu soit après l'addition de chaque réactif, soit après l'addition des deux réactifs,
- 4) à exciter le milieu résultant à la longueur d'onde d'excitation du composé fluorescent donneur,
- 5) à mesurer le signal émis par le composé fluorescent accepteur.

Dans un aspect préféré des procédés mentionnés ci-dessus, le premier réactif et le second réactif sont ajoutés simultanément au milieu contenant l'analyte recherché.

- Dans un aspect particulièrement avantageux selon l'invention, le composé fluorescent donneur utilisé dans les procédés mentionnés ci-dessus est un chelate, un cryptate ou un complexe macrocyclique de Eu^{3+} et le composé fluorescent accepteur est le complexe $(\alpha\text{AP}, \beta\text{AP})_3 \text{LC}$.

Dans un aspect ultérieur, l'invention concerne également l'utilisation d'un complexe phycobilliprotéine-peptide de liaison tel que défini plus haut dans

un procédé d'amplification du signal d'émission d'un cryptate ou d'un chélate de terre rare utilisé comme composé fluorescent donneur dans un dosage par fluorescence, dans lequel on met en oeuvre également un composé fluorescent accepteur, caractérisée en ce que le cryptate ou le chélate de terre rare possède un rendement quantique global faible et en ce que le rendement quantique de désactivation radiative du niveau émissif de la terre rare est inférieur au rendement quantique de l'accepteur, ledit accepteur étant constitué par ledit complexe phycobiliprotéine-peptide de liaison.

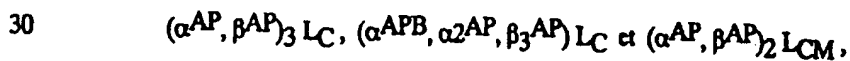
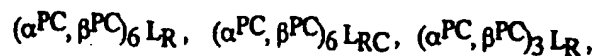
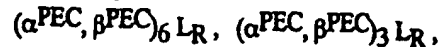
Dans un autre aspect, l'invention concerne également un conjugué fluorescent constitué d'un complexe phycobiliprotéine-peptide de liaison lié de manière covalente à l'un des éléments d'un couple de liaison spécifique ligand/récepteur.

Lesdits conjugués peuvent être en particulier utilisés pour trier les cellules et/ou analyser la surface cellulaire dans un procédé de cytométrie de flux, tel que décrit notamment dans Mel. N.Kronic, J. Immunological Methods, 1986, 92, 1-13.

A titre d'exemples de couples de liaison spécifique ligand/récepteur, on peut notamment citer des couples protéine/protéine, protéine/ADN ou encore ADN/ADN.

De préférence, la phycobiliprotéine utilisée selon l'invention est choisie parmi la phycoerythrine, la phycoerythrocyanine, la phycocyanine, l'allophycocyanine et l'allophycocyanine B et le peptide de liaison est choisi parmi les peptides L_R , L_C , L_{RC} et L_{CM} , tels que définis plus haut.

Avantageusement, le complexe phycobiliprotéine-peptide de liaison est choisi parmi les complexes



le complexe $(\alpha^{AP}, \beta^{AP})_3 L_C$ étant préféré.

De préférence, le complexe phycobiliprotéine-peptide de liaison est extrait d'une cyanobactérie choisie parmi *Mastigocladus Laminosus*, *Synechocystis* 6701, *Synechococcus* 6301, *Anabaena variabilis* et *Nostoc spec.*

Avantageusement, l'élément du couple de liaison spécifique ligand/récepteur est un récepteur, en particulier un récepteur cellulaire ou un anticorps. Ledit récepteur peut, par exemple, être l'avidine ou la streptavidine.

Dans un autre aspect avantageux, ledit élément est un ligand, notamment un analyte. Ledit ligand peut, par exemple, être un polypeptide, une lectine ou la biotine.

EXEMPLE : Dosage de l'antigène carcinoembryonnaire (ACE)

Un immunoessai homogène a été réalisé en utilisant comme composé donneur le cryptate d'euporium Eu trisbipyridine diamine préparé comme décrit dans la demande EP 321 353 (exemples 3 et 4) couplé à l'anticorps monoclonal G12 (CIS bio international, France) et comme composé accepteur soit l'allophycocyanine (Cyanotech, USA), soit le complexe $(\alpha\text{AP}, \beta\text{AP})_3\text{LC}$, couplées respectivement à l'anticorps monoclonal G15 (CIS bio international, France).

Les abréviations utilisées ci-après sont les suivantes :

- AP = allophycocyanine
- DTT = dithiotreitol
- EuTBP = cryptate d'euporium Eu trisbipyridine diamine
- BSA = sérum albumine bovine
- HSA = sérum albumine humaine
- IgG = immunoglobuline G
- SPDP = N-succinimidyl 3(2-pyridyldithio)propionate
- Sulfo-SMCC = sulfosuccinimidyl 4-n-maléimidométhyl)cyclohexane

1) PREPARATION DES CONJUGUES IgG G15-AP

a) Activation de l'AP par le sulfo-SMCC

L'AP (3 mg) commercialement fournie sous forme précipitée dans une solution à 60 % de sulfate d'ammonium, est centrifugée. Après élimination du surnageant, le culot est repris par 250 μl de tampon phosphate 100 mM, pH 7,0, puis filtré à 0,8 μm afin d'éliminer les éventuelles particules en suspension.

Le filtrat est purifié par chromatographie d'exclusion sur colonne G25 superfine (Pharmacia, Suède) dans le même tampon. La concentration d'AP élue dans le volume d'exclusion est déterminée à 650 nm, en considérant un $\epsilon_{650\text{nm}}$ de $731000\text{M}^{-1}\text{CM}^{-1}$.

- 5 L'activation de l'AP est réalisée en ajoutant une solution de sulfo-SMCC préparée extemporanément à raison de 6,9 mM dans un tampon phosphate 100 mM pH 7,0 et en laissant la réaction se produire pendant une heure, à température ambiante, sous agitation douce (rapport molaire de 15 à 75 sulfo-SMCC par AP). L'AP-maléimide est alors purifiée sur colonne G25 superfine en
10 tampon phosphate 100 mM, EDTA 5mM, pH 6,5 et conservée à 4°C avant couplage sur IgG 3D3.

b) Activation des IgG G15 par le SPDP

- Simultanément, 5mg d'IgG G15 à raison de 10 mg/ml dans un tampon phosphate 100 mM, pH 7,0 sont activés par l'ajout d'une solution de SPDP (Pierce,
15 USA) à raison de 6,4 mM dans du dioxane dans un rapport molaire de 7,5 SPDP par IgG G15.

Après 35 min d'activation à température ambiante, l'IgG pyridine-2 thione est purifiée sur colonne G25 superfine dans un tampon phosphate 100 mM, EDTA 5mM, pH 6,5.

- 20 Les protéines sont concentrées et les groupes 2-pyridyl disulfides sont réduits par une solution de DTT (Sigma, USA) ayant une concentration finale de 19 mM pendant 15 min à température ambiante. Le DTT et la pyridine-2-thione sont éliminés par purification sur colonne G25 superfine en tampon phosphate 100 mM, EDTA 5mM, pH 6,5. La concentration en IgG-SH est déterminée à 280 nm
25 avec un $\epsilon_{280\text{nm}}$ de $210000\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$.

c) Conjugaison des IgG G15-SH avec AP-maléimide

- La fixation des groupements thiols sur les maléimides est réalisée en ajoutant 2,51 mg d'AP activées par mg d'IgG G15-SH. Après 18 heures d'incubation à 4°C et à l'obscurité sous agitation douce, les fonctions thiols restées
30 libres sont bloquées par l'addition d'une solution à 100 mM de N-méthyl maléimide (Sigma, USA) ayant une concentration finale de 20 mM pendant une heure à température ambiante.

Le milieu réactionnel est purifié par gel filtration sur colonne TSK G3000SW semi-préparative (Beckmann, USA) en tampon phosphate 100 mM pH 7,0.

Les concentrations en AP et en IgG G 15 du conjugué purifié, élué dans le premier pic, sont déterminées par les absorptions à 280 nm et à 650 nm, selon le calcul suivant :

$$[AP] \text{ Mole/l} = A_{650\text{nm}} / 10000$$

$$[IgG] \text{ Mole/l} = (A_{280\text{nm}} - A'_{280\text{nm}}) / 210000$$

avec $A'_{280\text{nm}}$ étant la contribution à cette longueur d'onde de l'AP-maléimide, déterminée plus haut (paragraphe 1 - a).

De l'HSA est rajoutée à concurrence de 1 g/l au conjugué qui est ensuite réparti en aliquotes puis congelé à -20°C .

2) PREPARATION DES CONJUGUES IgG G15-(αAP , βAP)₃LC

a) Activation du complexe (αAP , βAP)₃LC par le sulfo-SMCC.

Le complexe (αAP , βAP)₃LC est obtenu à partir de l'algue *Mastigocladus Laminosus*. Après extraction de phycobilisomes, les complexes protéines-peptides de liaison sont purifiés selon P. Fuglistaller et coll. Biol. Chem. Hoppe Seyler 1986, 367, 601-614.

Les complexes présentent les caractéristiques suivantes :

$$- \epsilon_{650} = 1076000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}.$$

$$- DO_{650} / DO_{620} = 2,2.$$

A 1 ml de complexe (αAP , βAP)₃LC à 3 mg/ml en tampon phosphate 100 mM pH 7,0, on ajoute 19,5 μl d'une solution de sulfo SMCC (Pierce à 30 mmole/l dans le même tampon. On incube 30 mn à 30°C . Le produit de la réaction est purifié sur colonne G25 HR 10 x 10 débit 2ml/mn. La fraction éluee dans le volume mort est récupérée ($V = 1,7 \text{ ml}$). La concentration en complexe (αAP , βAP)₃LC maléimide est 1,4 mg/ml.

b) Activation des IgG G15 par le SPDP

Elle est réalisée comme indiquée au point 1, b) ci-dessus.

c) Conjugaison des IgG G15-SH avec le complexe (αAP , βAP)₃LC-maléimide.

1,7 ml de la solution obtenue au point 2, a est mise en contact avec 1 ml de la solution de IgG G15-SH à 0,9 mg/ml obtenue ci-dessus.

Après incubation une nuit à 4°C sous agitation par agitateur à rouleaux, le conjugué est purifié sur colonne TSK 4000 ½ préparative (Beckmann, USA) à débit de 4 ml/mn dans un tampon phosphate 100 mM pH7. Les fractions de 48 à 64 ml sont rassemblées et concentrées sur cône AMICON. La concentration en complexe (α AP, β AP)₃LC en mg/ml est donnée par la formule DO₆₅₀ / 10,76.

La concentration en IgG en mg/ml est donnée par la formule DO₂₈₀ - $\frac{DO_{650}}{5,25}$ / 1,4.

Le conjugué est à 120 µl/ml en IgG avec un rapport molaire de 1,6 complexe (α AP, β AP)₃LC / IgG DO₆₅₀ / 620 = 2,2.

10 3) PREPARATION DES CONJUGUES IgG G12-Eu TBP

La préparation de IgG G12-SH est réalisée selon le protocole décrit plus haut pour les G15 3D3 mais en faisant varier le rapport molaire de 4 à 16 SPDP par IgG G12.

15 A 5 mg ($5 \cdot 10^{-6}$ moles) de Eu TBP est ajoutée une solution à 25 mM de sulfo-SMCC, en tampon phosphate 20 mM, diméthylformamide 10 % (v/v pH 7,0 dans une proportion de 2,5 moles d'activateur par mole de Eu TBP.

Après 45 min d'activation à température ambiante, le milieu réactionnel est filtré à 0,8 µm afin d'éliminer le précipité éventuellement formé. Les produits réactionnels indésirables (sulfo-SMCC, N-hydroxysuccinimide, acide (N-maléimidométhyl) carboxylique) sont éliminés par chromatographie échangeuse d'ions sur colonne Mono Q (Pharmacia, Suède) en tampon phosphate 20 mM diméthylformamide 10 % (v/v), pH 7,0 sous choc de NaCl. La concentration en Eu TBP maléimide est déterminée à 307 nm avec un ϵ_{307nm} de 25000 M⁻¹ cm⁻¹ ainsi que le rapport A_{307nm}/A_{280nm}.

25 De façon similaire à celle décrite plus haut on fait réagir les fonctions maléimides avec les fonctions thiols fixés sur l'anticorps, dans des proportions molaires variant de 10 à 30 Eu TBP maléimide par IgG G12-SH.

Après 18 heures d'incubation à 4°C et blocage des groupements thiols (éventuellement restés libres) par N-méthylmaléimide, le Eu TBP non couplé est éliminé par dialyse en tampon phosphate 100 mM pH 7,0 à 4°C jusqu'à épuisement (plus de fluorescence dans les bains de dialyse).

30 Les caractéristiques du conjugué sont déterminées par ses absorptions à 307 nm et à 280 nm en utilisant les valeurs suivantes en tenant compte de l'absorption propre du cryptate déterminée par le rapport A_{307nm}/A_{280nm}.

Eu TBP-maléimide :

$$\epsilon_{307\text{nm}} = 25000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$$

$A_{307\text{nm}}/A_{280\text{nm}}$: déterminée expérimentalement.

IgG G12-SH :

$$\epsilon_{280\text{nm}} = 210000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$$

$$A_{307\text{nm}} = 0 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}.$$

4) APPLICATION AU DOSAGE DE L'ACE

Les conjugués G12-Eu TBP, G15-AP et G15-complexe
 10 $(\alpha\text{AP}, \beta\text{AP})_3\text{LC}$ sont dilués dans un tampon phosphate 100 mM, pH 6, BSA 1 g/l, KF 400 mM.

On ajoute successivement dans des microplaques en polystyrène (Dynatech, USA) :

15 - 100 μl de solution standard (sérum sans ACE) ou 100 μl d'échantillon à tester

- 100 μl de conjugué G12-Eu TBP à 0,5 $\mu\text{g/ml}$

- 100 μl de conjugué G15-AP à 5 $\mu\text{g/ml}$ ou 100 μl de conjugué G15-complexe $(\alpha\text{AP}, \beta\text{AP})_3\text{LC}$.

20 Après incubation pendant 3 h à 37°C on effectue la lecture à l'aide d'un fluorimètre à laser prototype, qui est décrit ci-après :

Un laser pulsé à azote (LASER SCIENCE INC., modèle LS1-337ND) est utilisé comme source d'excitation (longueur d'onde à 337,1 nm). La durée des pulsations est spécifiée à 3 nanosecondes et est répétée sous une fréquence de 10 Hertz. Le faisceau passe à travers un filtre (CORNING) afin d'éliminer toute
 25 lumière parasite à l'excitation autre que 337 nm.

Après être rentré dans la chambre de mesure, le faisceau est réfléchi par un filtre dichroïque, placé à 45 degrés, qui a la propriété de réfléchir les ultraviolets et de pouvoir transmettre la lumière visible.

30 Le faisceau réfléchi par le filtre dichroïque est focalisé sur le puits à mesurer d'une microplaque par une lentille en silice fondue. L'émission de fluorescence est collectée selon un angle solide de 20 degrés, collimatée par la même lentille, et passe directement à travers le filtre dichroïque (fluorescence en lumière visible).

Un filtre interférentiel, de caractéristiques définies selon la longueur d'onde de fluorescence à détecter, permet de se débarrasser des lumières pouvant parasiter le signal, dont l'intensité est ensuite mesurée par un photomultiplicateur (HAMAMATSU R2949).

5 Le compteur de photons utilisé est un SR-400 (STANFORD RESEARCH SYSTEMS), dont les opérations et la synchronisation avec le laser sont contrôlées par un ordinateur de type IBM PC-AT via une sortie RS 232. Les pulsations provenant du photomultiplicateur sont enregistrées pendant une fenêtre de temps (t_p) et après un délai (t_d) déterminés à condition qu'elles soient
10 supérieures à un niveau discriminant sélectionné par le compteur de photons afin d'optimiser le rapport signal/bruit du photomultiplicateur.

Une table X-Y, pilotée par l'IBM PC-AT, permet les différents positionnements de la microplaque de mesure par des moteurs pas à pas, incluant les manoeuvres de chargement, de positionnement sous le faisceau excitant, de
15 lecture automatique en séquentiel des 96 puits, et de sortie.

La fluorescence émise par le conjugué G15-AP ou G15-complexe (α AP, β AP) $_3$ LC est mesurée à l'aide du fluorimètre prototype équipé d'un filtre à 665 nm de 10 nm de largeur à mi-hauteur, pendant 400 μ s et avec un délai de 50 μ s.

20 Les résultats sont rapportés dans le tableau ci-dessous, exprimés en Δ cps correspondant à la différence entre le signal émis par l'échantillon à 665 nm par rapport à la solution standard (sérum sans ACE).

ACE ng/ml	AP Δ cps	Complexe (α AP, β AP) $_3$ LC Δ cps
4,4	251	388
15,9	966	1670
118	6427	9804
236	9436	16232

25

Les résultats montrent que le signal mesuré est supérieur pour le complexe phycobiliprotéine-protéine de liaison par rapport à la phycobiliprotéine seule.

De plus, on notera que le rapport $DO_{650}/DO_{620} = 2,2$ qui caractérise ledit complexe est constant dans la limite des erreurs de mesure pour toutes les étapes de la fabrication du conjugué et très différent de celui de l'AP ($\approx 1,45$).

- 5 Ceci démontre la stabilité du complexe phycobiliprotéine-peptide de liaison tout au long des étapes de purification et de couplage effectuées sans précautions particulières par rapport à celle des conjugués G15 AP.

REVENDEICATIONS

1. Utilisation d'un complexe phycobiliprotéine-peptide de liaison en tant que traceur fluorescent.
2. Utilisation d'un complexe phycobiliprotéine-peptide de liaison en tant que traceur fluorescent dans un procédé de détection et/ou de détermination par fluorescence d'un analyte dans un milieu susceptible de le contenir.
3. Utilisation selon la revendication 1 ou 2, caractérisée en ce que la phycobiliprotéine est choisie parmi la phycoerythrine, la phycoerythrocyanine, la phycocyanine, l'allophycocyanine et l'allophycocyanine B.
4. Utilisation selon l'une des revendications 1,2 ou 3 caractérisée en ce que le complexe phycobiliprotéine-peptide de liaison est extrait d'une cyanobactérie choisie parmi *Mastigocladus Laminosus*, *Synechocystis 6701*, *Synechococcus 6301*, *Anabaena variabilis* et *Nostoc spec.*
5. Utilisation selon l'une quelconque des revendications 1 à 4, caractérisée en ce que le peptide de liaison est choisi parmi les peptides L_R , L_C , L_{RC} et L_{CM} .
6. Utilisation selon l'une quelconque des revendications 1 à 5, caractérisée en ce que le complexe phycobiliprotéine-peptide de liaison est choisi parmi les complexes

$$(\alpha^{PEC}, \beta^{PEC})_6 L_R, (\alpha^{PEC}, \beta^{PEC})_3 L_R,$$

$$(\alpha^{PC}, \beta^{PC})_6 L_R, (\alpha^{PC}, \beta^{PC})_6 L_{RC}, (\alpha^{PC}, \beta^{PC})_3 L_R,$$

$$(\alpha^{AP}, \beta^{AP})_3 L_C, (\alpha^{APB}, \alpha_2^{AP}, \beta_3^{AP}) L_C \text{ et } (\alpha^{AP}, \beta^{AP})_2 L_{CM}.$$
7. Procédé homogène de détection et/ou de détermination par fluorescence d'un analyte dans un milieu susceptible de le contenir, par mise en évidence du produit de la réaction entre l'analyte et au moins un récepteur correspondant, consistant :
 - 1) à ajouter audit milieu un premier réactif constitué d'au moins un récepteur dudit analyte,
 - 2) à ajouter un second réactif choisi parmi l'analyte ou au moins l'un de ses récepteurs, l'un des deux réactifs étant couplé avec un composé fluorescent donneur constitué par un cryptate, un chélate ou un complexe macrocyclique de terre rare et l'autre réactif étant couplé avec un composé fluorescent accepteur, l'ordre d'ajout des réactifs pouvant être inversé et, après excitation du mélange

par une source de lumière à la longueur d'onde d'excitation du composé fluorescent donneur,

- 3) à mesurer le signal d'émission du composé fluorescent accepteur, caractérisé en ce qu'on utilise comme composé fluorescent accepteur un complexe phycobiliprotéine-peptide de liaison tel que défini selon l'une quelconque des revendications 1 à 6.

8. Procédé selon la revendication 7 consistant en une méthode par excès, caractérisé en ce qu'il consiste :

- 1) à ajouter, audit milieu contenant l'analyte recherché, un premier réactif constitué par au moins un récepteur dudit analyte, couplé avec un composé fluorescent donneur constitué par un cryptate, un chélate ou un complexe macrocyclique de terre rare,
- 2) à ajouter un second réactif constitué par un ou plusieurs autres récepteurs dudit analyte, ledit second réactif étant couplé avec un composé fluorescent accepteur constitué par un complexe phycobiliprotéine-peptide de liaison,
- 3) à faire incuber ledit milieu après chaque addition de réactifs ou après l'addition des deux réactifs,
- 4) à exciter le milieu résultant à la longueur d'onde d'excitation du composé fluorescent donneur,
- 5) à mesurer le signal émis par le composé fluorescent accepteur.

9. Procédé selon la revendication 7 consistant en une méthode par compétition, caractérisé en ce qu'il consiste :

- 1) à ajouter, audit milieu contenant l'analyte recherché, un premier réactif constitué par un récepteur dudit analyte, couplé avec un composé fluorescent donneur constitué par un cryptate, un chélate ou un complexe macrocyclique de terre rare,
- 2) à ajouter un second réactif constitué de l'analyte couplé avec un composé fluorescent accepteur constitué par un complexe phycobiliprotéine-peptide de liaison,
- 3) à faire incuber ledit milieu après chaque addition de réactifs ou après l'addition des deux réactifs,
- 4) à exciter le milieu résultant à la longueur d'onde d'excitation du composé fluorescent donneur,
- 5) à mesurer le signal émis par le composé fluorescent accepteur.

10. Procédé selon la revendication 7 consistant en une méthode par compétition, caractérisé en ce qu'il consiste :

- 1) à ajouter, audit milieu contenant l'analyte recherché, un premier réactif constitué par un récepteur dudit analyte, ledit récepteur étant couplé avec un composé fluorescent accepteur constitué par un complexe phycobilliprotéine-peptide de liaison,
- 2) à ajouter un second réactif constitué de l'analyte couplé avec un composé fluorescent donneur constitué par un cryptate ou un chélate de terre rare,
- 3) à faire incuber ledit milieu soit après l'addition de chaque réactif, soit après l'addition des deux réactifs,
- 4) à exciter le milieu résultant à la longueur d'onde d'excitation du composé fluorescent donneur,
- 5) à mesurer le signal émis par le composé fluorescent accepteur.

11. Procédé selon l'une quelconque des revendications 7 à 10, caractérisé en ce que le premier réactif et le second réactif sont ajoutés simultanément au milieu contenant l'analyte recherché.

12. Procédé selon l'une quelconque des revendications 7 ou 8, caractérisé en ce qu'on utilise un seul récepteur de l'analyte, qui est couplé soit avec le composé fluorescent donneur, soit avec le composé fluorescent accepteur.

13. Procédé selon l'une quelconque des revendications 7 à 12, caractérisé en ce que le composé fluorescent donneur est un chélate, un cryptate ou un complexe macrocyclique de terbium ou d'euprium.

14. Procédé selon l'une quelconque des revendications 7 à 13, caractérisé en ce que le composé fluorescent donneur est un chélate, un cryptate ou un complexe macrocyclique de Eu^{3+} et le composé fluorescent accepteur est le complexe $(\alpha\text{AP}, \beta\text{AP})_3 \text{LC}$.

15. Utilisation selon l'une quelconque des revendications 1 à 6 dans un procédé d'amplification du signal d'émission d'un cryptate ou d'un chélate de terre rare utilisé comme composé fluorescent donneur dans un dosage par fluorescence, dans lequel on met en oeuvre également un composé fluorescent accepteur, caractérisée en ce que le cryptate ou le chélate de terre rare possède un rendement quantique global faible et en ce que le rendement quantique de désactivation radiative du niveau émissif de la terre rare est inférieur au rendement quantique de

l'accepteur, ledit accepteur étant constitué par un complexe phycobiliprotéine-peptide de liaison.

16. Utilisation selon l'une quelconque des revendications 1 à 6, caractérisée en ce que le complexe phycobiliprotéine-peptide de liaison est utilisé en combinaison avec un ou plusieurs autres traceurs fluorescents.
17. Conjugué fluorescent constitué d'un complexe phycobiliprotéine-peptide de liaison lié de manière covalente à l'un des éléments d'un couple de liaison spécifique ligand/récepteur.
18. Conjugué selon la revendication 17, caractérisé en ce que la phycobiliprotéine est choisie parmi la phycoerythrine, la phycoerythrocyanine, la phycocyanine, l'allophycocyanine et l'allophycocyanine B.
19. Conjugué selon la revendication 17 ou 18, caractérisé en ce que le peptide de liaison est choisi parmi les peptides L_R , L_C , L_{RC} et L_{CM} .
20. Conjugué selon l'une des revendications 17 à 19, caractérisé en ce que le complexe phycobiliprotéine-peptide de liaison est choisi parmi les complexes $(\alpha^{PEC}, \beta^{PEC})_6 L_R$, $(\alpha^{PEC}, \beta^{PEC})_3 L_R$, $(\alpha^{PC}, \beta^{PC})_6 L_R$, $(\alpha^{PC}, \beta^{PC})_6 L_{RC}$, $(\alpha^{PC}, \beta^{PC})_3 L_R$, $(\alpha^{AP}, \beta^{AP})_3 L_C$, $(\alpha^{APB}, \alpha_2^{AP}, \beta_3^{AP}) L_C$ et $(\alpha^{AP}, \beta^{AP})_2 L_{CM}$.
21. Conjugué selon l'une des revendications 17 à 20, caractérisé en ce que le complexe phycobiliprotéine-peptide de liaison est extrait d'une cyanobactérie choisie parmi *Mastigocladus Laminosus*, *Synechocystis 6701*, *Synechococcus 6301*, *Anabaena variabilis* et *Nostoc spec.*
22. Conjugué selon l'une des revendications 17 à 21, caractérisé en ce que l'élément du couple de liaison spécifique ligand/récepteur est un récepteur, en particulier un récepteur cellulaire ou un anticorps.
23. Conjugué selon l'une des revendications 17 à 21, caractérisé en ce que l'élément du couple de liaison spécifique ligand/récepteur est un ligand, notamment un analyte.
24. Utilisation d'un conjugué selon l'une quelconque des revendications 17 à 23 dans un procédé de cytométrie de flux.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

F./FR 95/00865

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC 6 G01N33/533 G01N33/542 G01N33/58 C07K19/00 C07K14/195

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 6 G01N C07K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X A	US,A,4 857 474 (J.B. WATERBURY ET AL.) 15 August 1989 see the whole document -----	1-13, 15-24 14

☐ Further documents are listed in the continuation of box C.☒ Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents:

- *A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- *E* earlier document but published on or after the international filing date
- *L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

T later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

X document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

Y document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.

A document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

22 August 1996

Date of mailing of the international search report

19.09.96

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 cpo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Van Bohemen, C

Information on patent family members

FILE/FR 96/00865

Form PCT/ISA/210 (patent family sheet) (July 1992)

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande Internationale No

P./FR 96/00865

A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE
CIB 6 G01N33/533 G01N33/542 G01N33/58 C07K19/00 C07K14/195

Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB

B. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE

Documentation minimale consultée (système de classification suivi des symboles de classement)

CIB 6 G01N C07K

Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où ces documents relèvent des domaines sur lesquels a porté la recherche

Base de données électronique consultée au cours de la recherche internationale (nom de la base de données, et si cela est réalisable, termes de recherche utilisés)

C. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie *	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
X A	US,A,4 857 474 (J.B. WATERBURY ET AL.) 15 Août 1989 voir le document en entier -----	1-13, 15-24 14

☐ Voir la suite du cadre C pour la fin de la liste des documents

☒ Les documents de familles de brevets sont indiqués en annexe

* Catégories spéciales de documents cités

"A" document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent

"E" document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date

"L" document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée)

"O" document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens

"P" document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée

"T" document ultérieur publié après la date de dépôt international ou la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention

"X" document particulièrement pertinent, l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive par rapport au document considéré isolément

"Y" document particulièrement pertinent, l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier

"A" document qui fait partie de la même famille de brevets

Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée

22 Août 1996

Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale

19.09.96

Nom et adresse postale de l'administration chargée de la recherche internationale

Office Européen des Brevets, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tél. (+ 31-70) 340-2040, Tlx. 31 651 epo nl,
Fax (+ 31-70) 340-3016

Fonctionnaire autorisé

Van Bohemen, C

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Renseignements relatifs : membres de familles de brevets

Demande Internationale No

PCT/FR 96/00865

Document brevet cité au rapport de recherche	Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication
US-A-4857474	15-08-89	AUCUN	